



RAQUEL DIEGUES GUIMARÃES

**AÇÃO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA
Camellia sinensis NAS FORMAS DE CHÁ VERDE, CHÁ
PRETO E CHÁ BRANCO**

**LAVRAS - MG
2011**

RAQUEL DIEGUES GUIMARÃES

**AÇÃO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Camellia sinensis* NAS
FORMAS DE CHÁ VERDE, CHÁ PRETO E CHÁ BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador:

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

**LAVRAS - MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Guimarães, Raquel Diegues.

Ação antioxidante *in vitro* e *in vivo* da *Camellia sinensis* nas
formas de chá verde, chá preto e chá branco / Raquel Diegues
Guimarães. – Lavras : UFLA, 2011.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Edulcorantes. 2. Infusões. 3. Antioxidante. 4.
Lipoperoxidação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.94

RAQUEL DIEGUES GUIMARÃES

**AÇÃO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Camellia sinensis* NAS
FORMAS DE CHÁ VERDE, CHÁ PRETO E CHÁ BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 4 de agosto de 2011.

Dra. Cristiane Gattini Sbampato

Unincor

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS – MG
2011

A Deus, pelo dom da vida e pelo privilégio das provações.

OFEREÇO

À minha mãe, Verônica, ao meu pai, Francisco, e à minha irmã, Luciana, por todo o apoio, carinho e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar forças para me reerguer e não desistir da luta.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente, pela orientação, pelos ensinamentos, por toda compreensão e por sempre acreditar no meu potencial; exemplo que levarei para toda a minha vida.

Ao professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa, meu coorientador, por me abrir as portas de seu laboratório e por sua valiosa orientação e amizade; e também ao professor Dr. Pedro, por todo o ensinamento e paciência.

Aos professores do departamento de Ciência dos Alimentos, por toda a instrução que me proporcionaram.

Ao professor Dr. Allan Kardec Carlos Dias, por me dar o impulso inicial, essencial para que tudo isso se realizasse;

À amiga Regiane Lopes de Sales, primeira pessoa a me despertar o gosto pela docência, e a primeira a acreditar em minha capacidade.

À dona Maria Augusta, minha amiga Luciana e toda a sua família, pela doce acolhida e amizade sincera.

Ao querido amigo Alex, pela amizade e pelas caronas para Lavras, sempre acompanhadas por muitas risadas.

Aos colegas do laboratório de Química Orgânica, em especial ao Marcos, Lucilene, Juliana, Felipe, Maria Luiza, Milene e Cintia, por toda a colaboração.

Ao Willian, do Departamento de Medicina Veterinária, por sempre estar disposto a ajudar; à Cinthya e à Vivian, por me auxiliarem em meus experimentos, sempre com boa vontade e dedicação.

Ao professor Augusto Ramalho de Moraes, pelas análises estatísticas e por sempre me atender com amabilidade e prontidão.

Ao professor Eduardo Mendes Ramos, por todo o apoio e boa vontade; à Monaliza, por compartilhar seu conhecimento e estar sempre disposta a ajudar-me, inclusive nos finais de semana;

À minha família, socorro nos momentos difíceis, pela parceria nos momentos bons e ruins, e por assumir todas as batalhas ao meu lado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia impossível."

Charles Chaplin

RESUMO

Neste trabalho objetiva-se avaliar a ação antioxidante (AA) da *Camellia sinensis* *in vivo* e *in vitro*, traçando uma comparação entre três formas de processamento da planta: os chás-branco (CB), verde (CV) e preto (CP). As bebidas para os ensaios foram preparadas empregando-se a metodologia de infusões. Para os ensaios *in vitro*, empregou-se o método de sequestro de radicais livres – DPPH e o sistema β -caroteno / ácido linoleico (BCAL) nos três chás, puros ou adicionados dos açúcares branco (AB) e mascavo (AM), e adoçantes estévia (ST) e à base de sacarina/ ciclamato (Sac/Cicl). Os testes *in vivo* tiveram como objetivo avaliar a ação dos chás, sem adição de edulcorantes. Para isso, induziu-se injúria hepática em ratos wistar pela administração de tetracloreto de carbono por via intraperitoneal. Os animais foram tratados com os chás, por gavagem, durante sete dias, e após esse período, a extensão da injúria foi aferida por meio da avaliação da peroxidação lipídica nos fígados, e por parâmetros bioquímicos, como dosagem da glicose sérica, GGT, AST e ALT. Foram ainda confeccionadas lâminas para avaliação histopatológica dos fígados. Em todos os testes *in vitro*, os três chás demonstraram importante ação, e a capacidade de sequestrar radicais livres seguiu a seguinte ordem: CP = CB > CV. Com exceção da ST, a adição de edulcorantes reduziu a ação antioxidante dos três chás, sendo a redução mais significativa observada ao se adicionar o AM. Na avaliação da atividade antioxidante pelo sistema BCAL, a capacidade de estabilizar o sistema seguiu a ordem: CB>CP>CV. O CB foi o único entre os chás que apresentou redução da AA com adição de edulcorantes. O CV teve sua ação elevada com adição dos edulcorantes, com exceção do AM, que reduziu essa ação; o CP teve elevação da atividade com adição do adoçante Sac/Cicl, e os demais edulcorantes não provocaram nenhuma alteração. Nos ensaios *in vivo*, os três chás foram capazes de inibir a peroxidação lipídica ($P<0,05$), quando comparados ao grupo controle. Esta ação hepatoprotetora é confirmada pelos resultados obtidos por meio da dosagem de enzimas hepáticas no sangue e das análises histopatológicas nos fígados dos animais. Dessa forma, os chás provenientes da *Camellia sinensis* mostraram importante efeito antioxidante e hepatoprotetor.

Palavras-chave: Infusões. Edulcorantes. Antioxidante. Lipoperoxidação.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antioxidant activity of *Camellia sinensis* *in vivo* and *in vitro*, drawing a comparison between three ways of processing plant: white (CB), green (CV) and black tea (CP). The teas were prepared for testing using the methodology of preparation of infusions. For *in vitro* tests, it was used the free radical scavenger method - DPPH and β -carotene / linoleic acid system (BCAL) to three teas, pure or added of white (AB) and brown sugar (AM), and sweeteners stevia (ST) and saccharin / cyclamate (Sac / Cicl). The *in vivo* tests were conducted to evaluate the tea action, without added sweeteners. To do so, was induced liver injury in Wistar rats by administration of carbon tetrachloride intraperitoneally. The animals were treated with teas, by gavage for seven days, and after this period, the extent of injury was measured by assessing lipid peroxidation in the livers, and biochemical parameters, such as determination of serum glucose, GGT, AST and ALT. Histopathological evaluation of the livers was also performed. All *in vitro* tests showed the three teas important action, and the ability of radical scavenging activity following the order: CP = CB > CV. With the exception of stevia, a sweetened reduced the antioxidant action of the three teas, and the most significant reduction was observed when brown sugar was added. In the evaluation of antioxidant activity by the system BCAL, the ability to stabilize the system followed the order: CB > CP > CV. The CB was the only one of the teas that of AA decreased with added sweeteners. The CV had its high action with added sweeteners, except the brown sugar, which reduced this action. Black tea had increased activity with the addition of the sweetener Sac / Cicl, and other sweeteners did not cause any changes. On *in vivo* assays, the three teas were able to inhibit lipid peroxidation ($p < 0.05$) when compared to the control group. This hepatoprotective effect was confirmed by the results obtained through the measurement of liver enzymes in blood and histopathological examinations of the livers of animals. Thus, the teas from the *Camellia sinensis* showed significant antioxidant and hepatoprotective effect.

Keywords: Infusions. Sweeteners. Antioxidant. Lipoperoxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema de obtenção dos diferentes tipos de chá da planta <i>C. sinensis</i>	16
Figura 2	Aspecto geral da <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	17
Figura 3	Biossíntese dos flavonoides.....	22
Figura 4	Estrutura básica de um flavonoide	23
Figura 5	Catequinas do chá-verde.....	25
Figura 6	<i>Stevia rebaudiana</i>	35
Figura 7	2,2-difenil-1-picrilhidrazila na forma de radical livre	38
Figura 8	2,2-difenil-1-picrilhidrazila na forma reduzida	38
Figura 9	Concentração média dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol MDA / mg de tecido), em ratos tratados com chá-branco, chá- verde e chá-preto	51
Figura 10	Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST)	55
Figura 11	Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT).....	55
Figura 12	Cortes histopatológicos dos fígados dos animais tratados com tetracloreto de carbono e chás provenientes da <i>Camellia sinensis</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Açúcar branco
ABS	Absorbância
ALT	Alanina aminotransferase
AM	Açúcar mascavo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
C	Catequina
CB	Chá-branco
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CP	Chá-preto
CV	Chá-verde
EC	Epicatequina
EG	Epicatequina galato
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina galato
Gama GT	Gama glutamil transferase
SAC / CICL	Sacarina e ciclamato
ST	Estévia
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Chá	16
2.1.1	Chá-verde	18
2.1.2	Chá-branco.....	19
2.1.3	Chá-preto.....	19
2.2	Composição química dos chás.....	20
2.2.1	Compostos fenólicos.....	21
2.2.1.1	Flavonoides	22
2.2.1.2	Catequinas	24
2.3	Chás, estresse oxidativo e efeitos à saúde.....	25
2.4	<i>Camelia sinensis</i> e danos hepáticos.....	28
2.5	Indução da injúria hepática com tetracloreto de carbono e testes de função hepática	30
2.6	Edulcorantes.....	30
2.6.1	Açúcar	31
2.6.1.1	Açúcar Mascavo.....	32
2.6.2	Adoçantes.....	33
2.6.2.1	Sacarina e Ciclamato	33
2.6.2.2	Estévia.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Material vegetal e local de execução.....	36
3.2	Métodos.....	36
3.2.1	Obtenção das infusões	36
3.2.2	Avaliação da ação antioxidante <i>in vitro</i>	37

3.2.2.1	Atividade sequestrante de radicais livres DPPH.....	37
3.2.2.2	Ensaio do β -caroteno – ácido linoleico	39
3.2.3	Análises <i>in vivo</i>	40
3.2.3.1	Determinação da inibição da peroxidação lipídica	41
3.2.3.2	Determinação dos marcadores de função hepática.....	42
3.3	Delineamento experimental.....	43
3.4	Análise estatística	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de seqüestro de radicais livres - DPPH	44
4.2	Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno / ácido linoléico (BCAL)	48
4.3	Análise da ação antioxidante <i>in vivo</i>	52
4.3.1	Testes de função hepática.....	55
4.3.2	Avaliação Histopatológica	58
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE.....	75

1 INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, as plantas têm sido utilizadas como produtos terapêuticos. Em todo o mundo, milhares de produtos de origem vegetal são utilizados nas mais variadas formas: cataplasmas, infusão, macerado filtrado, tinturas, unguentos, pomadas, xarope, cápsulas e na sua forma *in natura* (TREVISANATO; KIM, 2000).

O chá é uma das bebidas mais consumidas do mundo, só perdendo para a água (CHENG, 2004; CHENG et al., 2008), estando bem à frente do café, da cerveja, do vinho e dos refrigerantes (RIETVELD; WISEMAN, 2003). Seu consumo era restrito a países da Ásia e Europa, mas a bebida despertou o interesse do mundo devido a estudos que mostram a relação inversa entre o consumo da bebida e o risco de doenças crônicas não infecciosas, como câncer e doenças do coração (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

As infusões de chá são encontradas nas formas de chá-verde (CV), chá-branco (CB) e chá-preto (CP), dependendo do tipo de processamento a que a planta foi submetida. Esses processos de produção alteram as propriedades sensoriais e antioxidantes, mediante a alteração dos compostos contidos em cada tipo de chá.

O chá da *C. sinensis* tem sido valorizado pela comunidade científica pelo seu potencial terapêutico, e seus benefícios são atribuídos às altas concentrações de antioxidantes. Esses compostos antioxidantes, contidos nos chamados alimentos funcionais, exercem efeitos benéficos à saúde humana quando presentes regularmente na dieta. Estudos epidemiológicos e experimentais mostram efeitos benéficos na função hepática na prevenção de injúrias, como cirrose e carcinomas, sendo, inclusive, utilizado como tratamento coadjuvante à terapia medicamentosa.

No Brasil, o chá geralmente é consumido acrescido de edulcorantes, visando melhorar a palatabilidade e, conseqüentemente, sua aceitação. Até o momento, muito pouco se conhece a respeito da interação entre esses edulcorantes e os compostos antioxidantes presentes nos chás, o que reforça as dúvidas a respeito da melhor forma de consumi-los, visando manter o máximo de suas propriedades funcionais.

Diante do exposto, neste trabalho tem-se como objetivo analisar a ação antioxidante da *C. sinensis* nas formas de chá-verde, chá-branco e chá-preto e verificar a influência da adição de edulcorantes nos três chás *in vitro*; e através de análises *in vivo*, avaliar seu efeito antioxidante na lipoperoxidação hepática induzida por tetracloreto de carbono, visando obter um estudo comparativo a respeito da ação hepatoprotetora desses chás.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Chá

As infusões de chá, consumidas por dois terços da população mundial, são obtidas das folhas da planta *Camellia sinensis* L. Kuntze (HAROLD; GRAHAM, 1992) e são geralmente consumidas na forma de chá-verde, chá - preto, chá-oolong e chá-branco (RUSAK et al., 2008). Os diferentes processos, que resultam nos diferentes tipos de chá, estão ilustrados na Figura 1.

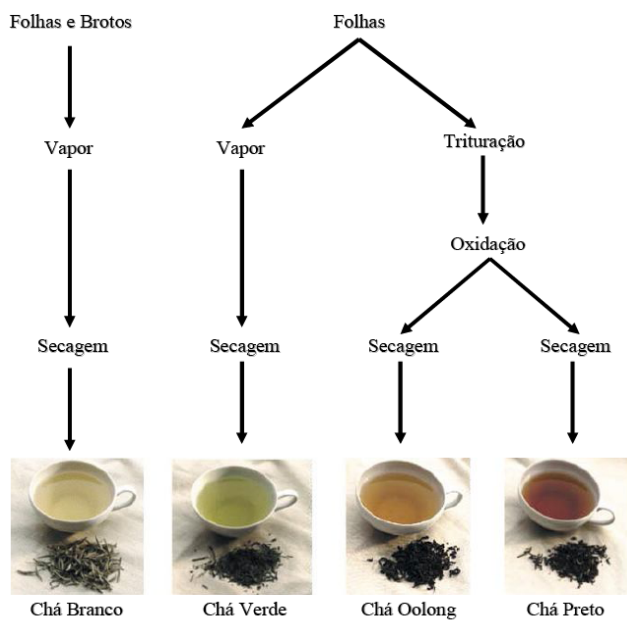


Figura 1 Esquema simplificado de obtenção dos diferentes tipos de chá da planta *C. sinensis*
Fonte Fanaro (2009)

A *Camellia sinensis* apresenta-se como arbusto ou árvore perene, com altura superior a 16 metros (FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001) (Figura 2), adaptada a meios com grandes variações climáticas (OWUOR et al., 2008), podendo ser cultivada em regiões úmidas e solos ácidos, desde o nível do mar até regiões montanhosas (HARA; LUO; WICKREMASHINGHE, 1995).



Figura 2 Aspecto geral da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze
Fonte: Paganini-Costa e Carvalho-da-Silva (2011)

A produção anual de folhas secas de *Camellia sinensis* é estimada em 1,8 milhão de toneladas, o que equivale a 40 litros de chá per capita em todo o mundo (CHENG et al., 2008).

Segundo a tradição chinesa, o chá foi descoberto pelo imperador Shen Nung no ano 2737 antes de Cristo. Na China antiga, o chá era considerado miraculoso por trazer vários benefícios à saúde, sendo utilizado como medicamento para dores de cabeça, dores no corpo, depressão, melhora da ação do sistema imune, para detoxificação, como energizante, antioxidante e como forma de prolongar a vida. A partir da China, por volta do ano 800 depois de Cristo, a bebida foi introduzida no Japão, e daí para o restante do mundo, por comerciantes e viajantes. Atualmente, o consumo de chá é assimilado por muitas culturas no mundo (IMTIAZ et al., 2004).

Na China, Japão e Inglaterra, a hora do chá é geralmente definida no período da tarde, entre as maiores refeições, em um ritual em que se busca total relaxamento. No entanto, o estilo de vida moderno tende a alterar essa relação, levando as pessoas a preferirem outras bebidas e os alimentos denominados “fast foods” ao consumo do chá.

2.1.1 Chá-verde

O consumo de CV é um hábito comum no Japão e em outros países asiáticos (TOKUNAGA et al., 2002) e representa aproximadamente 20% do total de chá consumido no mundo (SIDDIQUI et al., 2004). O chá é produzido por meio de folhas jovens de *Camellia sinensis*, as quais são enroladas e vaporizadas para minimizar a oxidação (RUSAK et al., 2008); o emprego de calor inativa a polifenol oxidase, conferindo a coloração verde, característica das folhas (KOO; NOH, 2007).

O CV contém compostos polifenólicos, que incluem flavanóis, flavandióis, flavonoides e ácidos fenólicos, que totalizam cerca de 30% do peso

seco das folhas. A maioria desses polifenóis são os flavanóis, dentre os quais predominam as catequinas (CHENG, 2000).

Quando comparado ao CP, que passa pelo processo de fermentação, o CV apresenta maior atividade antioxidante devido a uma maior concentração de (-) epigallocatequina galato (CHENG, 2000).

Uma bebida típica de CV é preparada na proporção de 1g de folhas para 100 mL de água, deixando-se em infusão por 3 minutos de fervura. A bebida preparada desta forma geralmente contém cerca de 33 – 35mg/100 mL de catequinas e 6 mg/100 mL de cafeína, dentre outros constituintes (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997).

2.1.2 Chá-branco

O CB representa um tipo de chá raro e de alto custo, pouco conhecido fora da Ásia (RUSAK et al., 2008). É uma bebida preparada com brotos e folhas muito jovens, colhidos apenas uma vez ao ano, no início da primavera. Apesar de numerosos dados sobre os constituintes fenólicos, atividade antioxidante e efeitos benéficos dos chás-verde e preto na saúde humana, pouco se sabe sobre o CB, que é o mais raro e menos processado dos chás (RUSAK et al., 2008). A planta não sofre nenhum processamento além da secagem pelo sol (SANTANA-RIOS et al., 2001), conferindo-lhe um sabor leve e delicado (RUSAK et al., 2008).

2.1.3 Chá-preto

O CP é o mais consumido entre os chás da *Camellia sinensis*, e a Índia é a maior produtora e exportadora dessa bebida (BHATTACHARYYA et al.,

2007). Esse chá difere do chá-oolong pela extensão da fermentação a que é submetido: o oolong é parcialmente fermentado, ao passo que o preto é completamente fermentado / oxidado (CHEN et al., 2009).

A produção de CP inicia-se com a colheita, em seguida as folhas murçam e passam por um processo de maceração, para finalmente passarem pela secagem. Durante a maceração das folhas, ocorre o rompimento da estrutura das células das folhas, quando a fermentação se inicia. O processo utilizado na produção desse chá reduz consideravelmente os níveis de catequinas a uma extensão bem maior que nos outros chás, que passam por condições menos severas de produção (CHENG, 2000); a redução ocorre devido à transformação das catequinas em teaflavinas por condensação (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Diversos pesquisadores relacionam o consumo desse chá com a redução da incidência de doenças coronarianas (CHENG, 2006); no entanto, Hertog et al. (1997) não encontraram essa relação ao realizarem a pesquisa no Reino Unido; os autores atribuem os resultados ao fato de a população no local consumir o chá-preto acrescido de leite.

2.2 Composição química dos chás

Geralmente, uma infusão preparada com 2,5 g de folhas de chá em 250 mL de água quente por 3 minutos contém cerca de 620 - 880 mg de compostos sólidos. Polifenóis, como as catequinas, quercetina, miricetina e kaempferol contabilizam aproximadamente de 30 a 42% do peso seco do chá (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997). O chá também contém ácidos fenólicos, principalmente o cafeico, quínico e gálico. Alguns taninos são encontrados nas folhas do chá, conferindo-lhes seu sabor adocicado. Segundo

Liao, Kao e Hiipakka (2001), os taninos são degradados a ácido glutâmico, possuindo efeitos de provocar relaxamento em humanos.

Os flavonoides e as catequinas são potentes antioxidantes, varredores de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação. Suas propriedades estão relacionadas com a presença, em sua estrutura, de radicais ligados aos seus anéis (SCHMITZ et al., 2005). A presença de grupos hidroxil na posição carbono 3 do anel C, de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e o número de radicais hidroxil ligados nos anéis A e B, aumentam sua atividade antioxidante (COOK; SAMMAN, 1996).

As folhas de chá são únicas na natureza; as catequinas, a cafeína e tanino são responsáveis pelo sabor e pelo flavor das bebidas à base de chás (IMTIAZ et al., 2004).

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, especializados em exercer funções fisiológicas (RUSAK; KRAJACIC; PLESE, 1997). As plantas os sintetizam para proteger-se contra o estresse oxidativo, contra espécies reativas de oxigênio e contra os herbívoros (IMTIAZ et al., 2004).

Os polifenóis também apresentam ações antinutricionais, como a capacidade de reduzir a absorção e digestibilidade dos alimentos devido à habilidade de se ligar a proteínas e minerais; no entanto, ações antiinflamatória, anticarcinogênica e antioxidante também são atribuídas a esses compostos, além de outros benefícios à saúde humana (IMTIAZ et al., 2004).

2.2.1.1 Flavonoides

Flavonoides são compostos fenólicos amplamente encontrados em tecidos vasculares de plantas, incluindo frutas, pólen, raízes e caules (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000). Com mais de 8000 compostos individuais conhecidos, os flavonoides são biossintetizados pela combinação dos ácidos chiquímico e acilpolimalonato. Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato, com posterior ciclização da estrutura (DI CARLO et al., 1999) (Figura 3). As subsequentes hidroxilações e reduções produzem diferentes formas de flavonoides (PIETTA, 2000).

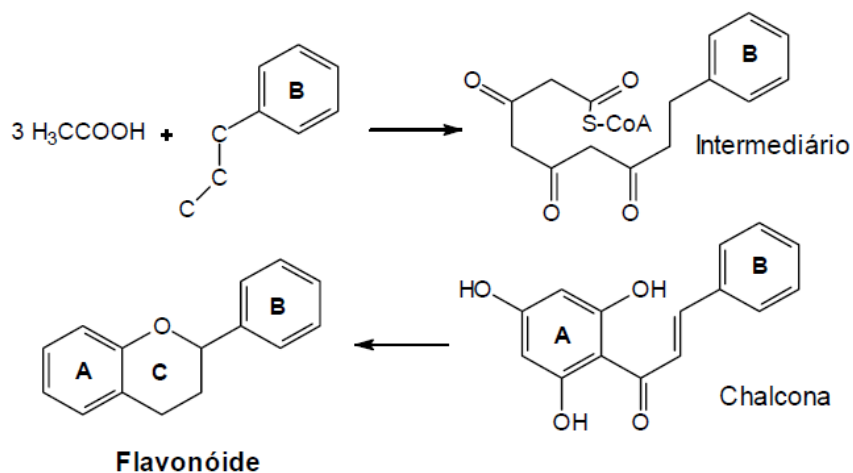


Figura 3 Biossíntese dos flavonoides
Fonte Pietta (2000)

Sua estrutura básica é constituída por um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 4) (DI CARLO et al., 1999).

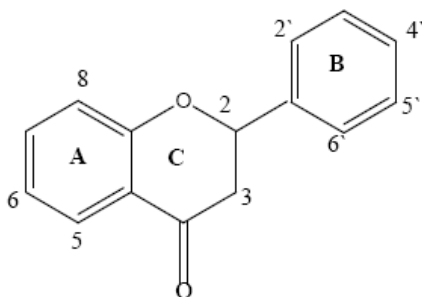


Figura 4 Estrutura básica de um flavonoide
Fonte Dornas et al. (2007)

Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (BRAVO, 1998).

2.2.1.2 Catequinas

As catequinas pertencem a um grupo de polifenóis encontrados nas folhas de *Camellia sinensis* (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). As principais catequinas encontradas na planta são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), (-) epigalocatequina galato (ECGC) e epicatequina galato (EG) (Figura 5) (SHARMA; KUMAR; RAO, 2008).

Entre as catequinas, a epigalocatequina galato representa de 50 a 80% do total de catequinas e acredita-se ser a responsável pela maior parte dos efeitos benéficos atribuídos ao chá (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001). A ECGC apresenta maior atividade antioxidante que as vitaminas C e E, que são antioxidantes conhecidas.

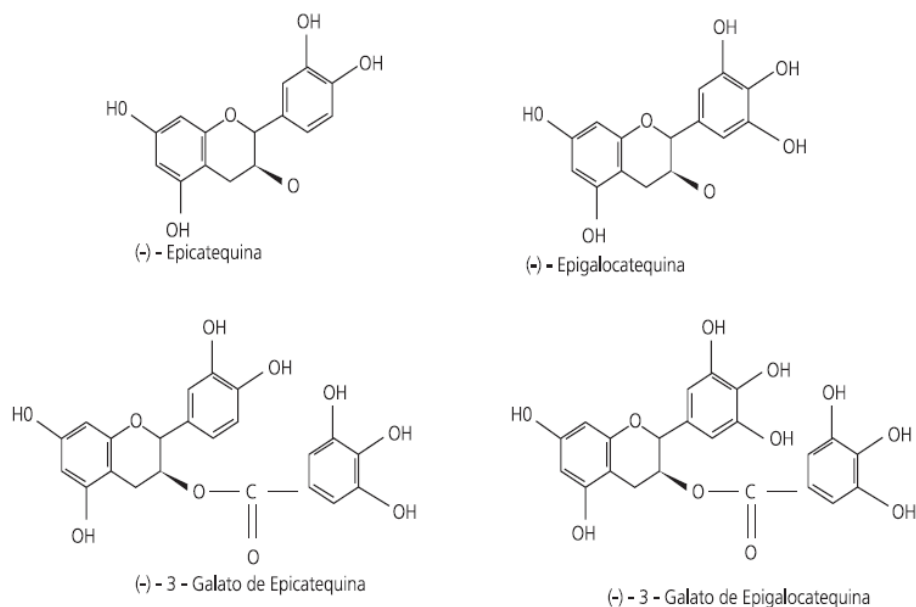


Figura 5 Catequinas do chá-verde
 Fonte Lamarão e Fialho (2009)

2.3 Chás, estresse oxidativo e efeitos à saúde

Evidências científicas sobre a ação dos alimentos sobre o metabolismo estão mudando a atual percepção de alimentação, e pesquisas sobre os benefícios à saúde podem modificar atitudes a respeito dessa bebida antiga. Dados científicos demonstram o impacto positivo dos alimentos na saúde humana, com especial ênfase aos eventos celulares. Muito interesse está centralizado nas atividades oxidante / antioxidante em relação ao processo de envelhecimento e doenças crônico-degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001; FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001).

O estresse oxidativo nas células e tecidos tem sido relacionado à ação de radicais livres, que estão ligados à etiologia de várias doenças degenerativas, tais como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares (STAHL; SIES, 1997), mutagênese e carcinogênese, sendo esses últimos causados por danos ao DNA (POULSEN; PRIEME; LOFT, 1998). Radicais livres podem ser intermediários de moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (HALLIWELL, 1994). São altamente instáveis, com meia vida curta e quimicamente muito reativos (POMPELLA, 1997). São capazes de causar oxidação em proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, além de causar danos às biomembranas, refletidos pelo aumento da peroxidação lipídica, assim comprometendo a integridade e a função celular.

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbica, inflamações, entre outros) e pela exposição a fatores exógenos, como radiações gama e ultravioleta, dieta, cigarro e medicamentos. A concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência de mecanismos antioxidantes (SIES, 1993). Antioxidantes são compostos que protegem as células contra o efeito prejudicial de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlet, superóxido, radicais hidroxil e peroxinitrito. O desbalanço entre antioxidantes e oxidantes pode resultar em diversas respostas fisiológicas, podendo levar a danos celulares ligados à origem do câncer, envelhecimento, aterosclerose, injúria isquêmica e inflamação (MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 2000).

A proteção antioxidante pode ser obtida por meio dos alimentos. A redução da ação de espécies reativas de oxigênio é importante para manter as funções biológicas do DNA, das proteínas e das membranas lipídicas. Os antioxidantes da dieta podem reagir e extinguir os radicais livres de oxigênio, por meio de processos quelantes com metais de transição, que ocorrem por

reações de redução; podem também agir induzindo a produção de enzimas antioxidantes, ou ainda suprimindo a geração de espécies reativas de oxigênio, como a ciclooxigenase no sistema biológico (SU et al., 2007).

Os flavonoides presentes nos chás obtidos da *C. sinensis* exercem a ação de proteger as células contra vários efeitos dessas espécies reativas de oxigênio. Os mais importantes são a quercetina, kaempferol e a rutina. Além disso, os chás são considerados as melhores fontes de catequinas, sendo a EGCG a mais abundante entre todos os componentes fenólicos existentes nas folhas secas da planta (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001; FARIA; SANTOS; VIANNA, 2006), além dos ácidos cafeico, quínico e gálico. A planta também é uma boa fonte de metilxantinas, principalmente na forma de cafeína, contendo cerca de um terço da quantidade total encontrada no café (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001; FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001).

Entre os efeitos benéficos à saúde humana, diversos estudos comprovam, além da atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória (NAG-CHAUDHURI et al., 2005), antimicrobiana (YAM; SHAH; HAMILTON-MILLER, 1997), hipoglicemiante (BARBOSA FILHO et al., 2006), antimutagênica (SANTHOSH; SWARNAM; RAMADASAN, 2005) e inibidora da enzima conversora de angiotensina (BARBOSA FILHO et al., 2006). Já foi demonstrado também o efeito do chá na elevação da termogênese, aumento na oxidação lipídica e redução na utilização de carboidratos, tendo importante ação na redução de peso (DULLO et al., 1999).

Tokunaga et al. (2002) realizaram um estudo por meio do qual se observou redução nos níveis séricos de colesterol, com o consumo de mais de 10 xícaras de chá por dia; porém, quando a ingestão foi associada aos aspectos de estilo de vida da população (tabagismo, uso de café e álcool), ao índice de massa corporal (IMC) e idade, essa redução foi observada com a ingestão de apenas uma xícara por dia.

Ferrara, Montesano e Senatore (2001) também recomendam a ingestão de 10 copos ou mais de chá-verde por dia para obter proteção contra danos hepáticos e melhora nos testes sanguíneos, mas salientam que, devido às propriedades estimulantes apresentadas pela *C. sinensis*, a ingestão deve ser restrita a três copos por dia (fornecem 240 - 320 mg de polifenóis), principalmente por indivíduos que sofrem de insônia, ansiedade e arritmia cardíaca. A mesma dose é recomendada para gestantes, e o último copo deve ser ingerido pelo menos 3 horas antes de dormir.

Estudos feitos nos últimos 10 anos mostram fortes evidências de que os antioxidantes polifenólicos reduzem a incidência de tumores em animais (JAVED; SHUKLA, 2000), incluindo órgãos, como pulmões (MUKHTAR; AHMAD, 2000), estômago, duodeno, pâncreas, esôfago, fígado (ZAVERI, 2006), pele (MANTENA et al., 2005; MUKHTAR; AHMAD, 2000) e próstata (HASTAK et al., 2003).

Além dos benefícios acima citados, as folhas são consideradas digestivas, diuréticas, úteis no tratamento de hemorroidas, inflamações e desordens abdominais (SENGOTTUVELU et al., 2008).

2.4 *Camellia sinensis* e danos hepáticos

O fígado é o mais importante órgão do metabolismo no organismo, recebendo 1500 mL de sangue por minuto. Está envolvido em operações metabólicas de anabolismo e catabolismo, e suas atividades refletem-se nas várias substâncias circulantes no sangue e presentes em outros fluidos corporais (BASU, 2003).

Danos hepáticos podem ser causados pelo aumento de radicais livres no organismo (CHEN et al., 2005) ou pela falência dos mecanismos de defesa antioxidantes (NAKAMOTO et al., 2009). Diversos estudos demonstram o

efeitos benéficos do chá no tratamento de danos hepáticos, como isquemia (ZHI et al., 2002), fibrose (ZHI et al., 2003) e injúria não alcoólica (LI et al., 2004).

Os compostos antioxidantes contidos na *Camellia sinensis* protegem os lipídios da membrana celular, os ácidos nucleicos e as proteínas contra os danos oxidativos (YANG; LANDEU, 2000), prevenindo ou tratando as desordens hepáticas. Nakamoto et al. (2009) concluíram em seus estudos que o chá foi capaz de prevenir a esteatose hepática a fibrose em animais, prevenção esta sugerida pela elevação dos antioxidantes plasmáticos e redução dos triglicerídeos viscerais induzidos por ingestão de dieta rica em lipídios.

No processo de lipoperoxidação, ocorre redução dos níveis das enzimas glutatona, superóxido dismutase e catalase, importantes na proteção das células e tecidos contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essa redução está provavelmente relacionada ao consumo dessas enzimas diante do grande número de radicais livres produzidos durante esse processo (SEGONTTUVELU et al., 2008). A glutatona é um tripeptídeo utilizado na síntese da glutatona peroxidase e é uma importante enzima antioxidante; exerce nos tecidos funções no estoque e transporte de cisteína, regulação no balanço oxidativo, metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, função imune e proliferação celular. A superóxido-dismutase é uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que, pela ação da catalase, é convertido em água e oxigênio molecular (LEITE; SARNI, 2003).

O consumo de chás provenientes da *C. sinensis* está diretamente relacionado ao aumento dos níveis dessas enzimas, além de elevar a síntese de proteínas totais, principalmente a albumina, acelerando o processo de regeneração e a proteção das células hepáticas (SEGONTTUVELU et al., 2008).

2.5 Indução da injúria hepática com tetracloreto de carbono e testes de função hepática

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um hidrocarboneto halogenado, muito utilizado em processos de síntese orgânica de compostos clorados, particularmente compostos aromáticos halogenados, e também na indústria de lavagem a seco, sendo um agente químico altamente tóxico, causando principalmente danos hepáticos, além de necrose tubular aguda no rim (FERREIRA, 2005). É um agente hepatotóxico que tem sido utilizado por décadas para induzir injúria hepática em diversos modelos experimentais para elucidar mecanismos de hepatotoxicidade. Experimentalmente, a resposta cirrótica induzida no animal pelo uso de CCl_4 tem mostrado ser similar à cirrose hepática em humanos (TAMAYO, 1983).

Entre os vários mecanismos envolvidos no efeito hepatotóxico do tetracloreto de carbono, um é o dano oxidativo pela geração de radicais livres, sendo necessária a ação antioxidante para desencadear mecanismos hepatoprotetores (DELEVE; KAPLOWITZ, 1995).

A integridade estrutural e funcional do fígado pode ser correlacionada com testes de função hepática, como níveis séricos de albumina (capacidade de sintetizar proteínas), amônia (integridade da circulação porta), ureia (capacidade detoxicante), glicose em jejum (indicação das reservas de glicogênio e capacidade de sintetizar glicose), fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltransferase (BASU, 2003).

2.6 Edulcorantes

Existem muitas definições para os termos adoçantes ou edulcorantes. O edulcorante será adotado neste trabalho para toda substância que adoça, sendo ela nutritiva ou não.

2.6.1 Açúcar

Todos os seres humanos apresentam boa aceitação pelo sabor doce. O açúcar, ou sacarose, é formado por dois monossacarídeos (glicose e frutose), e fornece 4kcal/g (TORLONI et al., 2007). É um dos vários compostos de sabor doce encontrados na seiva de diversas plantas, tal como na cana-de-açúcar, e é largamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas (LIMA, 2005).

O açúcar é adicionado a diversos alimentos industrializados por seu efeito conservante (antioxidante e antimicrobiano) e por proporcionar cor e textura aos alimentos, modificando sua maciez e viscosidade. Normalmente, 5% de sacarose são suficientes para adoçar o café, ao passo que refrigerantes contêm cerca de 10% (TORLONI et al., 2007).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (1978), “o açúcar deve ser fabricado de suco de cana ou de beterraba, livre de fermentação, isento de matéria terrosa, de parasitos e de detritos animais ou vegetais.” De acordo com a sua característica, pode ser classificado em:

- Açúcar cristal: contendo no mínimo 99,3% de sacarose.
- Açúcar refinado: contendo no mínimo 98,5% de sacarose.
- Açúcar moído: contendo no mínimo 98,0% de sacarose.
- Açúcar demerara: contendo no mínimo 96,0% de sacarose.
- Açúcar mascavo: contendo no mínimo 90,0% de sacarose.
- Açúcar mascavinho: contendo no mínimo 93,0% de sacarose.
- Açúcar-cande: contendo no mínimo 99,0% de sacarose.

- Açúcar glacê ou em pó ou de confeitiro: contendo no mínimo 99.0% de sacarose (excluído o antiaglutinante)
- Açúcar em cubos ou tabletes: contendo no mínimo 98.0% de sacarose (excluído o aglutinante)
- Açúcar para confeitir: açúcar finamente pulverizado ou em cristais, adicionado de corantes permitidos

A disseminação do uso de açúcar ocorreu a partir da segunda metade do século XVII, quando os Europeus passaram a consumir o chocolate, o café e o chá em maiores quantidades. Até então, essas bebidas eram consumidas sem adoçantes, tendo sabor amargo. A rápida elevação no consumo de açúcar se deu paralelamente ao aumento do consumo dessas bebidas, principalmente na Inglaterra (LEMPS, 1998 citado por FLANDRIN; MONTANARI, 2007).

Após a colheita da cana-de-açúcar, a produção do açúcar refinado passa pelas seguintes etapas: extração e peneiramento do caldo para a separação do bagacilho, clarificação do caldo para remoção das substâncias que conferem coloração escura, formação do xarope por evaporação da água do caldo, concentração do xarope para provocar a formação dos cristais de açúcar, cristalização, turbinação, secagem do açúcar para retirar o excesso de umidade e ensacamento (ARAÚJO, 2007).

Durante o processo de produção de açúcar ocorre a reação de Maillard, com formação de caramelos provenientes de reações de degradação e condensação da glicose e da frutose pela combinação desses com aminoácidos, formando as melanoidinas (ARAÚJO, 2007).

2.6.1.1 Açúcar Mascavo

O açúcar mascavo é produzido a partir do caldo de cana extraído pelo esmagamento dos colmos maduros da cana de açúcar. O aspecto marrom-claro a escuro é devido ao fato deste açúcar não passar por processos elaborados de clarificação do caldo (CHAVES, 1998).

O açúcar mascavo apresenta em sua composição: sacarose, frutose, glicose, cálcio, potássio, magnésio, fósforo, sódio, manganês, ferro e zinco (SILVA et al., 2003).

2.6.2 Adoçantes

A busca por produtos que tenham características e sabor semelhantes à sacarose é feita por indivíduos que, por alguma razão, precisam substituir a sacarose em suas dietas. Existem vários produtos que suprem essa necessidade, mas nem todos são seguros para o consumo humano, e ao mesmo tempo têm estabilidade e boa ação edulcorante (CARDOSO; BATTOCHIO; CARDELLO, 2004); são permitidos pela legislação brasileira: a sacarina, o ciclamato, o aspartame, a sucralose e o esteviosídeo (BRASIL, 1995).

Os adoçantes são substitutos artificiais ou naturais do açúcar, compostos por substâncias edulcorantes (que adoçam) e por um agente de corpo, que confere aparência, textura e durabilidade ao produto. Diversos adoçantes contêm dois ou mais edulcorantes associados, com a finalidade de potencializar as vantagens de cada um e neutralizar as desvantagens, principalmente o sabor residual (TORLONI et al., 2007).

2.6.2.1 Sacarina e Ciclamato

A sacarina é uma substância derivada da naftalina e possui poder edulcorante 400 vezes maior do que o açúcar. É absorvida pelo trato intestinal, e é excretada sem ser metabolizada; por isso, não fornece calorias. Foi descoberta

acidentalmente em 1879 e utilizada como alternativa à escassez de açúcar nas últimas guerras mundiais (LONDON, 1988).

Quando usada em altas concentrações, a sacarina tem sabor amargo; por isso, passou a ser associada a outros edulcorantes a partir de 1950, com a descoberta do ciclamato (TORLONI et al., 2007).

O ciclamato é constituído pelo ácido ciclohexilsulfâmico e sais de potássio, cálcio e sódio. Possui poder edulcorante de 30 a 140 vezes o do açúcar (AMERICAN DIETETICAN ASSOCIATION, 2004) e é considerado um adoçante não calórico. Não tem sabor residual e é estável ao calor. Geralmente é associado à sacarina, atenuando seu sabor desagradável (TORLONI et al., 2007).

2.6.2.2 Estévia

A estévia é extraída da planta *Stevia rebaudiana* (Figura 6), um dos 154 membros do gênero *Stevia*. É utilizada como adoçante em chás há séculos, desde a época dos índios guaranis na América do Sul. Os glicosídeos responsáveis pelo dulçor foram descobertos em 1931, e são utilizados como adoçantes não calóricos por brasileiros e japoneses (MADAN et al., 2009).



Figura 6 *Stevia rebaudiana*
Fonte Madan et al. (2009)

A estévia é originária do Paraguai, e apresenta propriedades medicinais e poder edulcorante. Sua ação edulcorante se deve à presença de oito glicosídeos diterpênicos presentes nas folhas da planta, predominando o esteviosídeo e o rebaudiosídeo-A (LIMA FILHO; MALAVOLTA, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e local de execução

O material vegetal (folhas desidratadas de *C. sinensis* na forma de chá-verde, chá-branco e chá-preto) foi obtido no comércio da cidade de São Paulo – SP. Os açúcares e edulcorantes foram obtidos do comércio varejista da cidade de Lavras – MG.

Os experimentos foram realizados na UFLA – Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras, MG, nos laboratórios de Química Orgânica do Departamento de Agroquímica; Fisiologia Animal, do Departamento de Medicina Veterinária; Tecnologia de Carnes e Pescados, do Departamento de Ciência dos Alimentos.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das infusões

Para o preparo das infusões, 100 mL de água em ebulição foram adicionados sobre 1g de folhas desidratadas, acondicionadas em béquer. As folhas ficaram em infusão por um minuto, e logo após procedeu-se à filtração.

Para o preparo dos chás adicionados de edulcorantes, após a filtração, adicionaram-se separadamente a cada tipo de chá 4g de sacarose (S), 4g de açúcar mascavo (AM), 10 gotas de adoçante à base de estévia (ST) e 10 gotas de adoçante à base de sacarina e ciclamato (Sac / Cicl). Cada solução foi agitada manualmente por 20 segundos.

3.2.2 Avaliação da ação antioxidante *in vitro*

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, utilizaram-se os métodos de atividade sequestrante de radicais livres DPPH e o ensaio do β caroteno / ácido linoleico.

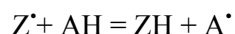
Para título de comparação, os testes foram realizados também com cada edulcorante dissolvido em água.

3.2.2.1 Atividade sequestrante de radicais livres DPPH

O método é baseado na redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Figura 7) em solução metanólica por antioxidantes, que causam alteração da coloração violeta da solução a um tom pálido. A mudança na coloração leva a uma redução na absorbância, que pode ser detectada por espectrofotometria (BLOIS, 1958).

Quando à solução de DPPH é acrescida uma substância doadora de átomos de hidrogênio, tem-se sua transformação na forma reduzida, com consequente perda da coloração violeta e formação de uma coloração pálida residual, devido ao grupo picril ainda presente (MOLYNEUX, 2003) (Figura 8).

Representando o radical DPPH por Z, e a molécula doadora por AH, a reação primária pode ser representada da seguinte forma:



Em que ZH é a forma reduzida e A^{\bullet} é o radical livre produzido nesta primeira fase. Este radical produzido pode se submeter a novas reações que são responsáveis pela estequiometria geral, ou seja, o número de moléculas de DPPH reduzidas por uma molécula do agente redutor (MOLYNEUX, 2003).

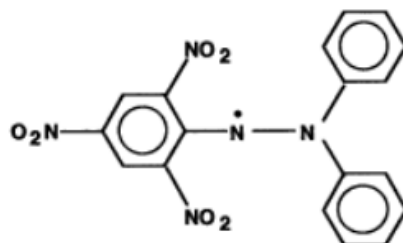


Figura 7 2,2-difenil-1-picrilhidrazila na forma de radical livre
Fonte Molineux (2003)

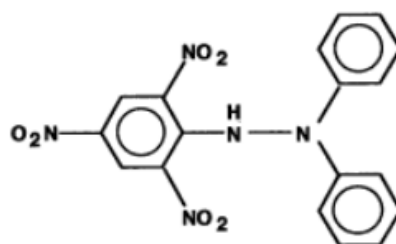


Figura 8 2,2-difenil-1-picrilhidrazila na forma reduzida
Fonte Molineux (2003)

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH foi feita pelo método descrito por Sousa et al. (2007).

Preparou-se uma solução estoque de DPPH em metanol na concentração de $40 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, que foi mantida em baixa temperatura e na ausência de luz até o uso.

A reação ocorreu pela adição de 2,7 mL da solução estoque e 0,3 mL das infusões em tubos de ensaio. Para o controle, utilizaram-se 2,7 mL da

solução de DPPH e 0,3 mL de água. Para o branco, utilizaram-se 2,7 mL de metanol e 0,3 mL de água.

As medidas das absorbâncias das misturas reacionais foram realizadas a 515 nm, e as leituras foram realizadas imediatamente após o preparo das soluções e com intervalo de 60 minutos, com as amostras mantidas em local escuro.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada utilizando os valores de absorbância testadas, no tempo de 60 min, utilizando-se a equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

Em que: $Abs_{controle}$ é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) e Abs_{branco} é a absorbância do metanol (SOUSA et al., 2007).

3.2.2.2 Ensaio do β -caroteno – ácido linoleico

Para o ensaio do β caroteno – ácido linoleico, utilizou-se a metodologia descrita por Lopes-Lutz et al. (2008).

Preparou-se uma solução estoque composta por 6 mg de β -caroteno dissolvido em 10 mL de clorofórmio (grau analítico), 60 μ L de ácido linoleico e 600 mg de Tween 20. O clorofórmio foi completamente evaporado em evaporador rotatório acoplado a uma bomba de vácuo. Posteriormente, 150 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescidos na mistura sob agitação constante. Em seguida, colocaram-se 2,5 mL da mistura resultante (emulsão A) em tubos de ensaio e sobre essas foram acrescidos 0,2mL dos extratos. Para ser utilizado com zero de absorbância no espectrofotômetro, uma segunda emulsão (B), consistindo de 60 μ L de ácido linoleico, 600 μ g de Tween

20 e 150 mL de água saturada com oxigênio também foi preparada, e a 2,5 mL dessa emulsão foram acrescidos 0,2 mL de água.

As leituras das amostras foram feitas imediatamente ($t=0$) e em intervalos de uma hora em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 470 nm. Todas as análises foram feitas em triplicatas. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [(A_{a(120)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(102)})] \times 100$$

Em que:

$A_{a(120)}$ é a absorbância do antioxidante no tempo de 120 min, $A_{C(120)}$ é a absorbância do controle a 120 min, e $A_{C(0)}$ é a absorbância do controle no $t = 0$ min (LOPES-LUTZ et al., 2008).

3.2.3 Análises *in vivo*

Para o ensaio *in vivo*, foram utilizados 25 ratos com peso de 204 ± 14 g, todos do sexo feminino, obtidos no biotério da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno com tampa de aço, distribuídos em cinco tratamentos, sendo cinco animais em cada um. O fotoperíodo (12h claro/12h escuro) foi controlado. Água e ração comercial foram oferecidos *ad libitum*, e os animais receberam camas de maravalha. Para a indução da injúria hepática, utilizou-se a técnica de Ozercan et al. (2006), em que foram administrados por via intraperitoneal doses de 2,4 mg / Kg (P/P) de tetracloreto de carbono (CCl_4), solubilizado na proporção de 1:1 em óleo de oliva por 3 dias não consecutivos (1º, 3º e 5º dias).

Os animais foram divididos em 5 grupos contendo 5 animais em cada um, conforme abaixo:

- Controle negativo (receberam somente água por gavagem e veículo (óleo de oliva) por via intraperitoneal);
- Controle Positivo (água por gavagem + CCl₄ em óleo de oliva)
- Teste 1 (CCl₄ em óleo de oliva + infusão de chá-verde por gavagem)
- Teste 2 (CCl₄ em óleo de oliva + infusão de chá-branco por gavagem)
- Teste 3 (CCl₄ em óleo de oliva + infusão de chá-preto por gavagem).

Os chás-preto, verde, branco e a água foram administrados por gavagem, uma vez ao dia, por 7 dias. A dose utilizada foi de 3,6mL/kg/dia, correspondendo a 5 xícaras de 50mL da bebida. No oitavo dia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico, na dose de 40mg/kg de peso, para retirada do sangue por punção cardíaca após 12 horas de jejum, e logo após submetidos à eutanásia por exsanguinação para retirada do fígado. O sangue foi centrifugado em seguida para retirada do soro. O fígado foi lavado com solução salina 0,9% e armazenado a -20°C, submerso em solução tampão fosfato (pH 7,4). Os fígados foram destinados à avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) e à confecção de lâminas para análise histopatológica.

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras, e aprovado sob o protocolo n°016/11, em 3 de maio de 2011.

3.2.3.1 Determinação da inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi determinada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Raharjo, Sofos e Schmidt (1992). Os produtos da peroxidação de lipídios reagem com o ácido tiobarbitúrico, produzindo um composto que apresenta absorvância a 531 nm.

Os fígados dos animais foram pesados (5g) e homogeneizados em homogeneizador de tecidos por 1 minuto, após adição de 20mL de ácido tricloroacético a 5% (TCA) e 0,5mL de BHT a 0,15%. As amostras foram, então, filtradas em papel-filtro, e o volume completado para 25mL com TCA em balão volumétrico.

Alíquotas de 2mL foram retiradas do balão e transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 2mL de ácido tiobarbitúrico 0,08M em ácido acético 50% (TBA). Os tubos foram levados ao banho-maria fervente por 5 minutos, e resfriados em água gelada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 531nm.

A concentração de TBARS foi calculada com base na curva padrão de dialdeído malônico (MDA: 1,1,3,3 - tetraetoxipropano). Os resultados foram expressos em moles MDA / mg de tecido.

3.2.3.2 Determinação dos marcadores de função hepática

Os parâmetros ALT, AST, gama GT e glicose foram determinados por método enzimático colorimétrico e cinético no soro dos animais.

3.2.3.3 Preparação das lâminas para análise histopatológica

Foram coletadas amostras dos fígados dos animais, e cada uma delas foi fixada em formol neutro tamponado a 10%. O material foi incluído em parafina e cortes histológicos de 4µm de espessura foram obtidos de cada um dos fragmentos, por meio de micrótomo rotativo manual. Os cortes obtidos foram, então, corados segundo técnica de Hematoxilina e Eosina (BANCROFT; STEVENS, 1996).

3.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com parcelas subdivididas.

Para a atividade antioxidante *in vitro*, foram utilizados 3 tipos de bebida (chá-verde, branco e preto), puros e adicionados de 4 diferentes adoçantes e edulcorantes.

Para as análises *in vivo*, foram utilizadas 3 tipos de bebidas, 2 tratamentos (com indução de injúria hepática e sem indução) e 5 repetições.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de seqüestro de radicais livres - DPPH

Na Tabela 1 estão representados os resultados das análises da atividade sequestrante de radicais livres dos três chás, acrescidos ou não de edulcorantes.

Tabela 1 Atividade antioxidante (AA%) dos chás em relação ao radical DPPH

Tipos de Chá	Puro	Edulcorantes			
		Açúcar Branco	Açúcar Mascavo	Estévia	Sacarina/ Ciclamato
Branco	92,53 aA	89,71 bB	70,02 cC	91,88 aA	90,05 aB
Verde	89,26 bA	86,75 cBC	85,99 bC	88,36bAB	85,55 bC
Preto	92,91 aA	91,57 aAB	89,03 aC	91,29 aAB	91,09 aB
Média	91,57	84,34	81,68	90,51	88,90

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes dentro de cada coluna, e médias seguidas por letra maiúsculas diferentes dentro de cada linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os chás provenientes da *Camellia sinensis* apresentaram um bom poder sequestrante de radicais livres, que pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos, com destaque aos taninos (ácido gálico) e flavonoides (miricetina, quercetina, catequinas e canferol) (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Os flavonoides apresentam um grupo hidroxila na posição 3 do anel aromático, essencial à sua habilidade de capturar radicais livres, apresentando atividade maior que a vitamina C *in vitro* (RICE-EVANS, 1999).

Entre os chás estudados, o branco e o preto apresentaram ação sequestrante de radicais livres semelhantes, e maiores que a apresentada pelo

chá- verde. No entanto, os resultados encontrados na literatura são discordantes; em seus estudos, Rusak et al. (2008) classificaram os chás de acordo com o total de compostos fenólicos na ordem: CV > CP > CB; já Lin, Wu e Lin (2003) classificaram CP > CV > CB.

Vários autores apresentam diferentes explicações para essa variedade de resultados encontrados. Harold e Grahan (1992) afirmam em seu estudo que o CP teria maior ação antioxidante pelo fato de os polifenóis mais encontrados nas folhas da *C. sinensis*, principalmente as catequinas, terem sua concentração dependente da idade da planta, e geralmente encontrarem-se em maior concentração nas folhas do chá-preto, quando comparadas às do chá-verde; Bancirova (2010) e Sarkar e Bhaduri (2001) também atribuem maior habilidade em sequestrar radicais livres ao CP quando comparado ao CV; já Moraes et al. (2009) encontraram maior ação antioxidante no chá-verde e menor no chá-preto, e Moraes-de-Souza et al. (2007) não encontraram diferença na AA destes dois chás.

Corroborando os resultados obtidos neste estudo, Unachukwu et al. (2010), ao determinar a concentração de catequinas em chás pelo método HPLC, afirmaram que o teor encontrado nas folhas do CB foram superiores aos encontrados no CV, conferindo a esse primeiro maior ação antioxidante.

Os diferentes resultados encontrados na literatura podem ser relacionados às diferentes condições de cultivo, processamento, manufatura e embalagem da planta, além dos protocolos utilizados em cada estudo para extração dos compostos e das fontes comerciais (UNACHUKWU et al., 2010).

Em relação à atividade antioxidante dos chás adicionados de edulcorantes, o chá branco tem sua atividade reduzida com a adição de açúcar branco, açúcar mascavo e adoçante composto por sacarina e ciclamato. Com a adição da estévia, a AA não sofreu alterações significativas.

Resultados semelhantes aos do chá-branco foram observados no chá-verde quando este sofreu adição dos edulcorantes; a maior ação antioxidante foi observada no chá puro e no chá adicionado de estévia ou açúcar branco. Menores atividades foram observadas quando se acrescentaram açúcar mascavo e adoçante à base de sacarina e ciclamato.

O chá-preto não sofreu alterações na sua ação antioxidante quando acrescido de açúcar branco ou estévia; os edulcorantes açúcar mascavo e adoçante Sac/Cicl apresentaram ação antioxidante semelhantes, porém menor que os demais edulcorantes. Sharma, Kumar e Rao (2008), ao analisarem o teor de compostos fenólicos no CP, os encontraram reduzidos, quando se adicionou açúcar branco ao chá, com conseqüente redução da sua capacidade de sequestrar radicais livres. Segundo os mesmos autores, são necessárias investigações a respeito da interação entre o chá e o açúcar, com a finalidade de elucidar seu mecanismo.

Em todas as infusões estudadas, a adição de açúcar mascavo levou a uma redução da ação antioxidante de radicais livres, ao se analisar a AA dos edulcorantes separadamente; em solução aquosa, nota-se que esse açúcar apresenta ação antioxidante muito superior, quando comparado ao açúcar refinado, conforme demonstrado na Tabela 2, e os demais edulcorantes não apresentaram ação nenhuma. Possivelmente, pode ter ocorrido uma ação antagonista entre os componentes dos chás e do AM, o que é conhecido como “efeito da mistura” (CUVELIER; MAILLARD; BERSET, 1996).

Tabela 2 Atividade Antioxidante (AA%) dos edulcorantes em solução aquosa em relação ao radical DPPH

Edulcorantes	AA (%)
Açúcar Branco	6,12 ± 1,23
Açúcar Mascavo	84,58 ± 0,26
Estévia	0
Sac/Cicl	0

Essa forte atividade antioxidante pode ser explicada pelo fato de a cana-de-açúcar ser rica em compostos fenólicos e flavonóides, o que lhe confere uma interessante ação antirradicais (FONTANIELLA; SING; SMADJA, 2003). No entanto, os resultados deste estudo contrariam aqueles obtidos por Payet, Sing e Smadja (2005) que, ao testarem a ação antioxidante de 8 tipos de açúcares mascavo dissolvidos em água, encontraram uma fraca ação contra os radicais DPPH, e atribuíram esse fato à baixa concentração de compostos fenólicos. Segundo os mesmos autores, a concentração de compostos antioxidantes pode variar de acordo com o processo de produção do açúcar mascavo, no qual há formação de compostos derivados da reação de Maillard, que também possuem ação antioxidante, além das condições de cultivo da cana-de-açúcar. Na reação de Maillard, há formação de melanoidinas, polímeros e de compostos heterocíclicos aromáticos; esses compostos, além de atuarem conferindo coloração e aroma característicos do açúcar, apresentam também ação antioxidante (DITTRICH et al., 2003).

Na Tabela 3, estão demonstrados os resultados do estudo comparativo entre os tratamentos.

Tabela 3 Atividade antioxidante pelo método DPPH (AA%): estimativas de contrastes entre médias dos tratamentos.

Comparação	Chá- Branco	Chá-Verde	Chá-Preto
Chá puro VS Edulcorantes	-7,12*	-2,6*	-2,17*
Açúcares VS adoçantes	11,10*	0,59 ^{ns}	0,89*
Açúcar Branco VS Açúcar Mascavo	-19,69*	-0,76 ^{ns}	-2,54*
Estévia VS Sacarina / Ciclamato	-1,83*	-2,82*	-0,21 ^{ns}

*Significativo pelo teste F ao nível de 5%.

Os chás puros apresentam maior capacidade antioxidante, e têm essa ação reduzida quando a eles são adicionados edulcorantes; por outro lado, entre as substâncias que conferem dulçor, o grupo dos adoçantes apresentou maior ação antioxidante quando associado aos chás em relação ao grupo dos açúcares, principalmente ao chá-branco. Entre os açúcares, a adição de açúcar branco foi mais eficaz ao capturar os radicais livres, ao passo que entre os adoçantes, a estévia mostrou-se mais indicada.

4.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno / ácido linoleico (BCAL)

Na Tabela 4 estão representados os resultados da atividade antioxidante dos chás, acrescidos ou não de edulcorantes.

Tabela 4 Ação antioxidante (AA%) pelo sistema β -caroteno / ácido linoleico dos chás acrescidos ou não de agentes edulcorantes.

Chá	Edulcorantes				
	Puro	Açúcar Branco	Açúcar Mascavo	Estévia	Sacarina/Ciclamato
Branco	91,74 aA	52,75 bB	56,49 bB	47,43 bB	54,28 bB
Verde	51,76 cD	74,18 aB	62,62 ab CD	70,49 aBC	93,61 aA
Preto	68,95 bBC	58,74 bC	66,55 aBC	70,24 aB	86,40 aA

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes dentro de cada coluna, e médias seguidas por letra maiúsculas diferentes dentro de cada linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os chás apresentaram diferentes ações antioxidantes, seguindo a seguinte ordem: CB>CP>CV.

Paganini-Costa e Carvalho-da-Silva (2011) atribuem a maior ação antioxidante ao CB ao fato de ser o menos processado entre os chás, o que preservaria a alta quantidade de catequinas da planta fresca. Zhao et al. (2011), ao compararem a composição do CB e do CV, encontraram uma diferença bastante significativa na quantidade de flavonoides, sendo maior no CB, e não encontraram diferenças na quantidade de catequinas entre os dois chás. Thring, Hili e Naughton (2009) atribuem ao chá-branco maior ação antielastase, anticollagenase e antioxidante que o CV.

O CP apresentou ação antioxidante intermediária entre os chás; na literatura, muitas vezes é citado como tendo ação antioxidante menor que o CV devido ao processamento que sofre durante sua produção, com a conversão das catequinas em teaflavinas e tearrubiginas. No entanto, pesquisas relatam que catequinas e teaflavinas apresentam atividades antioxidantes similares (LEUNG et al., 2001), o que pode justificar os resultados encontrados no presente estudo.

O CV mostrou menor ação antioxidante entre os chás, o que contraria os resultados de alguns autores quando este é comparado ao CP (KWON et al., 2009; LEE; LEE; LEE, 2002).

A ação antioxidante do CB é reduzida quando se adiciona edulcorantes a esse chá; no entanto, não houve diferença significativa em decorrência da adição de um edulcorante específico: todos apresentaram atividade semelhante.

O CV apresentou sua maior ação quando adicionou-se a ele adoçante sacarina/ciclamato; em seguida, a maior ação foi apresentada por adição de estévia e açúcar branco, e menor pelo chá puro e pelo açúcar mascavo, embora a ação antioxidante deste último não seja estatisticamente diferente daquela apresentada pela estévia.

O CP apresentou resultado semelhante ao do chá-verde: sua ação antioxidante foi maior quando adicionou-se a ele sacarina e ciclamato, e os demais edulcorantes apresentaram ação semelhante: ST = AM = AB; no entanto, a ação do chá com estévia foi maior do que a observada com o açúcar branco

O CP puro não sofreu alterações em sua AA com a adição de açúcar mascavo, açúcar branco ou estévia. Sharma, Kumar e Rao (2008), em suas pesquisas, observaram que a adição de açúcar foi responsável por aumentar e estabilizar a ação antioxidante do CP, fato que não ocorreu neste trabalho.

A atividade antioxidante dos edulcorantes em solução aquosa no sistema BCAL foi observada somente no açúcar branco (41,3%) e no mascavo (57,62%) (Tabela 5), inferindo-se novamente que, com o CB, esses açúcares possam ter exercido ação antagônica com os compostos fenólicos presentes, reduzindo a atividade antioxidante; no CV, a adição de AB aumentou sua ação, ao passo que o AM se reduziu; e no CP, não houve alteração. São necessárias mais investigações a respeito do mecanismo que leva a essas interações entre os edulcorantes e os chás.

Tabela 5 Atividade antioxidante (AA%) pelo sistema β -caroteno / ácido linoleico dos edulcorantes em solução aquosa

Edulcorantes	AA (%)
Açúcar Branco	41,23 \pm 0,62
Açúcar Mascavo	57,62 \pm 1,03
Estévia	0
Sac/Cicl	0

Comparando-se a ação antioxidante entre os grupos (Tabela 6), pode-se observar que, entre os chás, o branco é o único que apresenta ação maior sem a adição de edulcorantes, e é o único em que a adição de açúcares reduziu a AA; os chás-verde e preto apresentaram mais vantagens em ser consumidos com açúcar mascavo em comparação ao branco, e adoçante contendo sacarina e ciclamato em comparação à estévia.

Tabela 6 Ação antioxidante (AA) pelo sistema β -caroteno / ácido linoléico: estimativas de contrastes entre médias dos tratamentos.

Comparação	CB	CV	CP
Chá puro VS edulcorantes	-39*	23,46*	1,53 ^{ns}
Açúcares VS adoçantes	-3,76 ^{ns}	13,65*	15,67*
Açúcar Branco VS Açúcar Mascavo	3,73 ^{ns}	11,57*	7,81*
Estévia VS Sacarina / Ciclamato	6,85 ^{ns}	23,12*	16,16*

*Significativo pelo teste F no nível de 5%

O sistema β -caroteno/ácido linoleico (BCAL) é utilizado para se avaliar quanto um composto é capaz inibir a oxidação do β -caroteno, pois esse sofre descoloração rápida na ausência de um antioxidante por ação do ácido linoleico, que forma hidroperóxidos responsáveis pela perda da cor. Pela oxidação, a molécula de caroteno perde sua dupla ligação, perdendo seu cromóforo e sua cor laranja característica, que pode ser medida espectrofotometricamente a uma absorvância de 470 nm (SHARMA; KUMAR; RAO, 2008).

4.3 Análise da ação antioxidante *in vivo*

Os dados de variação do peso corporal estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Peso corporal e relação peso do fígado / peso corporal dos animais submetidos aos tratamentos.

Tratamentos	Variáveis		
	Varição (g)	Peso Fígado (PFg)(g)	Relação PFg / PFn
Controle	1,40 a	6,06 b	0,030 b
CCl ₄	-17,25 b	7,36 ab	0,039 a
Chá-Verde	-20,40 b	7,27 ab	0,039 a
Chá-Branco	-9,40 b	7,85 ab	0,039 a
Chá-Preto	-20,00 b	8,61 a	0,046 a

Médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Observa-se que os animais que não receberam a dose intraperitoneal de tetracloreto de carbono não apresentaram perda de peso e menor relação peso do fígado / peso corporal, quando comparados aos animais dos demais tratamentos. Já nos que receberam a dose, foi possível observar um aumento na relação peso do fígado / peso corporal. O tratamento com CCl₄ leva ao aumento do tamanho e do peso do fígado, por elevar os lipídios totais, colesterol e triglicerídeos totais

no órgão (ABDEL-HARMID, 2006). Esses resultados estão de acordo com Mukai et al. (2002), que encontraram aumento significativo na relação peso do fígado / peso dos animais após administração de CCl_4 .

O tetracloreto de carbono é uma conhecida e potente droga hepatotóxica, que causa dano hepático pela formação de radicais livres durante a sua metabolização, como o triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) e o triclorometilperóxil ($\cdot\text{OCCl}_3$) (PERES et al., 2000). A indução da injúria por tetracloreto de carbono envolve duas fases: na primeira, o CCl_4 é metabolizado pelo citocromo P450, com formação de radicais livres e peróxidos lipídicos. Na segunda fase, ocorre a ativação das células de Kupffer, principalmente por radicais livres, levando à produção de mediadores pró-inflamatórios (EDWARDS; KELLER; THURMAN, 1993). Esses radicais causam peroxidação dos ácidos graxos constituintes das membranas celulares, resultando na fragmentação em radicais peróxidos lipídicos e outros produtos que agem como agentes oxidantes. Conseqüentemente, a estrutura da membrana celular e a membrana intracelular das organelas são completamente deterioradas, e o dano estrutural se expande. Com isso ocorrendo de maneira crônica, há desenvolvimento de cirrose e fibrose (OZERCAN et al., 2006; SCHMITZ et al., 2005).

A administração intraperitoneal de CCl_4 causou importante lipoperoxidação hepática, como pode ser visto na Figura 9.

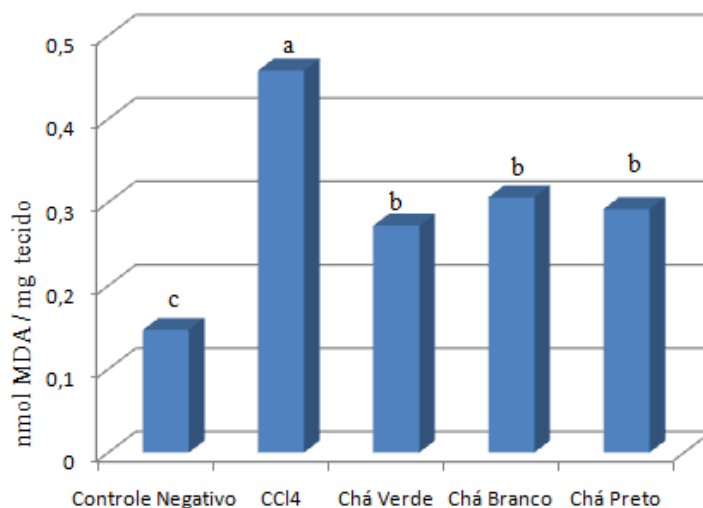


Figura 9 Concentração média dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol MDA / mg de tecido), em ratos tratados com chá-branco, chá-verde e chá-preto. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

No presente estudo, foi possível observar que o tetracloreto de carbono causou lesão hepática nos ratos, devido à alta concentração de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico presentes nos fígados dos animais (CP); observa-se também que a administração dos chás durante sete dias foi capaz de reduzir essa peroxidação lipídica; diferentemente da ação antioxidante *in vitro*, não houve diferença significativa entre a ação do chá-branco, verde e preto.

Noori et al. (2009) não encontraram redução significativa nos níveis de TBARS em animais com injúria hepática induzida por tetracloreto de carbono tratados com chá-verde. Já Sengottuvelu et al. (2008) apresentaram resultados contrários, e em seus estudos, o chá-verde foi capaz de reduzir a peroxidação hepática. Almurshed (2006) encontrou resultados semelhantes a Sengottuvelu et al. (2008) ao testar os chás-preto e verde.

4.3.1 Testes de função hepática

Neste estudo, o dano hepático no grupo que recebeu o CCl_4 é evidenciado pelos elevados níveis séricos de AST (Figura 10), ALT (Figura 11) e Gama GT, além da elevação da glicemia de jejum (Tabela 8) em relação ao grupo controle negativo. Níveis menores dessas enzimas foram encontrados nos grupos tratados com os chás; no entanto, esses níveis foram maiores que os do grupo controle negativo, que não receberam a dose do agente causador da injúria hepática. Mukai et al. (2002) observaram expressiva elevação nos níveis séricos de AST e ALT em ratos com injúria no fígado induzidas por CCl_4 . Sengottuvelu et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes no grupo tratado com tetracloreto de carbono, e os animais tratados com chá-verde tiveram um aumento das transaminases em relação ao grupo controle; porém, bem menos significativo quando comparado ao grupo com injúria hepática induzida. Almurshed (2006) observou a redução nos níveis séricos de ALT com administração dos chás-verde e preto em ratos que receberam tratamento semelhante.

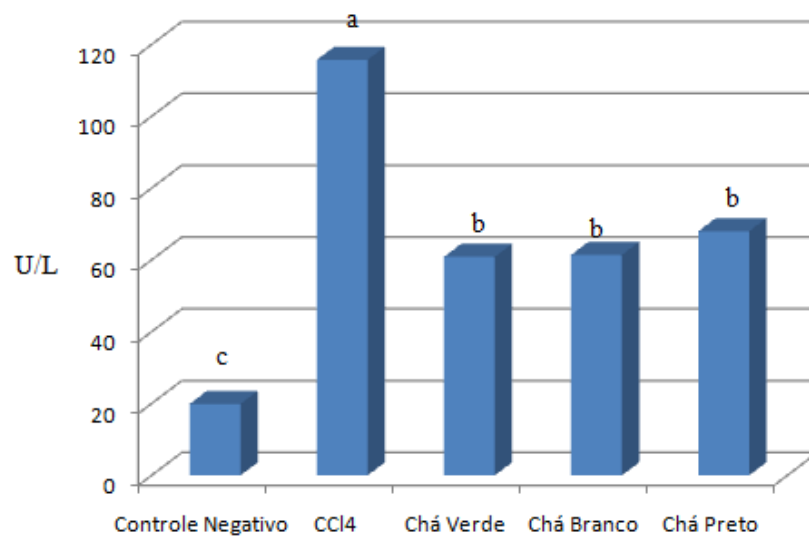


Figura 10 Atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

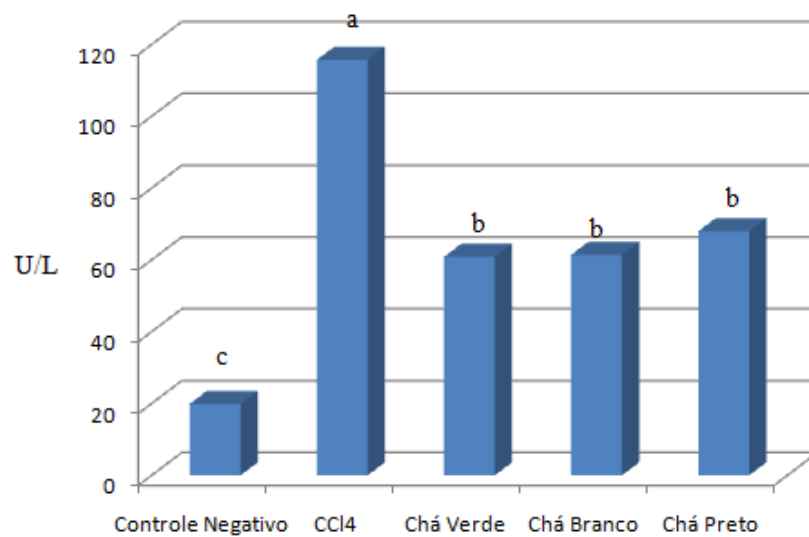


Figura 11 Atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Medidas das atividades das enzimas ALT e AST séricas são testes muito utilizados como marcadores de injúria hepatocelular ou necrose. Seus níveis podem se elevar em diversas desordens hepáticas; no entanto, entre as duas enzimas, obtém-se maior especificidade ao se dosar a ALT, pois ela está presente no citosol das células hepáticas em maiores concentrações que nas demais células do organismo. Já a AST está presente em tecidos do fígado, coração, osso, músculo, rins, cérebro, pâncreas e pulmões, e nas células sanguíneas (GIBONEY, 2005).

Pelos dados da Tabela 8, os níveis séricos da GGT diferenciam-se significativamente ($p < 0,05$) entre o controle positivo, o controle negativo e os grupos teste. Entre os três chás testados, não houve diferença nos níveis desse marcador de lesão hepática.

A gama glutamil transferase (GGT) sérica é utilizada como marcador de disfunção hepática e de ingestão alcoólica. Condições que elevam a GGT, como doença hepática obstrutiva, consumo de álcool e utilização de drogas indutoras, levam a um aumento da produção de radicais livres, principalmente na presença de ferro (WHITFIELD, 2001).

Alterações nos níveis de glicemia são comuns em doenças hepáticas; a hipoglicemia geralmente é observada na doença hepática aguda e grave (MEZEY, 1991). Conforme apresentado na Tabela 8, o grupo que recebeu o tetracloreto de carbono e não recebeu os chás apresentou níveis de glicemia inferiores ao grupo controle negativo. Os grupos tratados com os chás não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 8: Valores médios dos parâmetros bioquímicos Gama GT e glicose (mg/dL) para avaliação da função hepática dos animais experimentais.

Tratamentos	Parâmetros bioquímicos	
	Gama GT	Glicose
Controle Negativo	1,434 c	143,29 a
CCl ₄	2,436 a	105,96 b
Chá-Verde	1,709 b	129,44 ab
Chá-Branco	1,710 b	125,37 ab
Chá-Preto	1,742 b	123,94 ab

Médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

O aumento dos marcadores de lesão hepática AST, ALT e GGT plasmáticos são considerados diretamente proporcionais à gravidade da injúria hepática. Pelos resultados obtidos neste estudo, infere-se que os antioxidantes presentes nos chás são eficazes em reduzir a hepatotoxicidade causada pela administração de CCl₄. Portanto, a ingestão diária de cerca de cinco xícaras de chá é benéfica para a saúde, sendo indicada para indivíduos portadores de desordens hepáticas.

4.3.2 Avaliação Histopatológica

Os resultados dos estudos histopatológicos da ação dos chás da *Camellia sinensis* no fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono estão demonstrados na Figura 12.

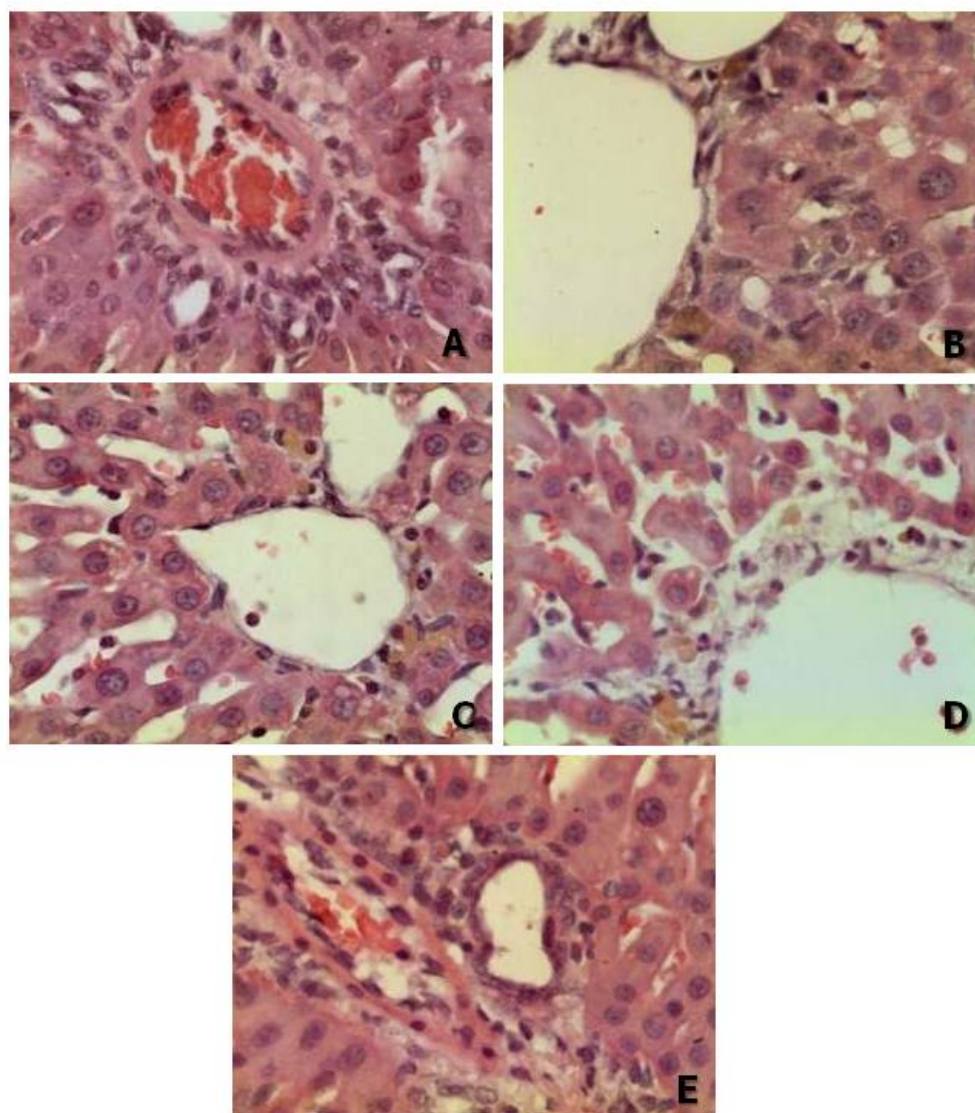


Figura 12 Fotomicrografias dos fígados dos animais tratados com tetracloreto de carbono e chás provenientes da *Camellia sinensis*. A) Controle Negativo: alterações não são observadas; B) Controle Positivo (CCl_4): presença de macrófagos e células vacuolizadas; C) grupo tratado com CV: presença de macrófagos e células vacuolizadas; D) grupo tratado com CB: presença de macrófagos e células vacuolizadas; E) Grupo tratado com CP: número reduzido de macrófagos e células vacuolizadas em relação aos demais tratamentos. Coloração H.E. (ampliação de 400 vezes).

O grupo tratado com CCl_4 (A) mostrou marcadores histopatológicos de alterações hepáticas, como infiltrações de macrófagos e vacuolização celular, principalmente ao redor da veia centrolobular. Segundo Almurshed (2006), vacuolização do citoplasma pode ocorrer devido à degeneração hidrópica ou lipídica. A degeneração hidrópica ocorre devido ao acúmulo de água no meio intracelular, consequência de desequilíbrios no controle do gradiente osmótico no nível da membrana citoplasmática e nos mecanismos de absorção, eliminação de água e eletrólitos intracelulares (MIRANDA; SANTOS, 2008). A degeneração gordurosa é um desequilíbrio entre a captação hepática dos ácidos graxos e sua utilização (JONES; HUNT; KING, 2000). As principais causas da esteatose são: hipoxemia (a gordura transportada para o fígado não é oxidada e fica retida); ação de agentes tóxicos (arsênio, clorofórmio, tetracloreto de carbono, micotoxinas) e insuficiência de fatores lipotróficos (colina e metionina) (COELHO, 2002). No grupo controle negativo (B), não foram detectadas alterações.

O grupo tratado com o CP (E) apresentou redução das células inflamatórias e da vacuolização dos hepatócitos quando comparado aos demais tratamentos, o que sugere maior eficácia desse chá no tratamento de desordens hepáticas.

Sengottuvelu et al. (2008) concluíram em seus estudos que a administração de extrato aquoso da *Camellia sinensis* foi capaz de reduzir a infiltração de células inflamatórias, reduzir e regenerar a necrose de hepatócitos de ratos tratados com CCl_4 , e atribuem esses efeitos à ação antioxidante da planta. Almurshed (2006) observou ação semelhante ao estudar o efeito do CV e do CP, ou seja, observou redução nas alterações histopatológicas no fígado dos animais.

Embora, histopatologicamente, somente o CP tenha demonstrado ser eficaz na redução do dano hepático, bioquimicamente os animais tratados com

CV e CB demonstraram redução significativa ($p < 0,05$) das enzimas hepáticas séricas em relação ao grupo CP. Dessa forma, infere-se que os chás derivados da *Camellia sinensis* sejam capazes de reduzir danos hepáticos rapidamente, já que os resultados deste estudo foram obtidos após sete dias de tratamento, sendo o seu consumo indicado não somente na prevenção como também no tratamento de diversas desordens hepáticas.

5 CONCLUSÃO

Os diferentes processamentos a que a planta *Camellia sinensis* é submetida leva a alterações, não só nos seus aspectos sensoriais, mas também em sua ação antioxidante, e a adição de edulcorantes também são capazes de alterar essas propriedades dos chás.

Nos ensaios *in vivo*, a dosagem de enzimas hepáticas séricas dos animais e o teste de peroxidação lipídica inferem a eficácia dos três chás em recuperar a injúria hepática induzida pelo tetracloreto de carbono. Na avaliação histopatológica, apenas os fígados dos animais tratados com o CP apresentaram redução dos danos celulares; no entanto, os demais testes realizados demonstram que os três chás podem desempenhar ação hepatoprotetora.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HARMID, N. M. Diphenyl bicarboxylate as an effective treatment for chemical-induced fatty liver in rats. **African Journal of Biomedical Research**, Pretoria, v. 9, p. 77-81, May 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução CNNPA nº 12**, de 27 de julho de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Brasília, 1978. Disponível em: <http://74.125.45.132/search?q=cache:JczMRPbu6moJ:www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_acucar.htm+legisla%C3%A7%C3%A3o+a%C3%A7%C3%BAcar&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br>. Acesso em: 8 maio 2011.

ALMURSHED, K. S. Protective effect of Black and Green tea against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. **Saudi Medical Journal**, Riyadh, v. 27, n. 12, p. 1804-1809, Dec. 2006.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v. 104, n. 2, p. 255-275, Feb. 2004.

ARAÚJO, F. A. D. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método de bicarbonatação. **Revista Ciências & Tecnologia**, Piracicaba, ano 1, n. 1, p. 1-6, jul./dez. 2007.

BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 37, n. 8, p. 693-704, Aug. 1997.

BANCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 5, p. 1379-1382, Sept. 2010.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, P. **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone: Elsevier, 1996. 766 p.

BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): a review between 1980-2000. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 421-446, jul./set. 2006.

BASU, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. **Toxicology**, Limerick, v. 189, p. 113-127, July 2003.

BHATTACHARYYA, N. et al. Detection of optimum fermentation time for black tea manufacturing using electronic nose. **Sensors and Actuators B, Chemical**, Lausanne, v. 122, n. 2, p. 627-634, Feb. 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 318, de 24 de novembro de 1995. Aprova o uso de sucralose com a função de edulcorante em alimentos e bebidas dietéticas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 227, p. 194061, 28 nov. 1995. Seção 1.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, Nov. 1998.

CARDOSO, J. M.; BATTOCHIO, J. R.; CARDELLO, H. M. A. B. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 448-452, jul./set. 2004.

CHAVES, J. B. P. **Como produzir rapadura, melado e açúcar mascavo**. Campinas: Centro de Produções Tecnológicas, 1998. 120 p.

CHEN, A. S. et al. Effect of chitobiose and chitotriose on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 1971-1973, Oct. 2005.

CHEN, H. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 229, n. 4, p. 629-635, May 2009.

CHENG, T. O. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 301-308, Apr. 2006.

CHENG, T. O. Tea is good for the heart. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 160, n. 15, p. 2397-2398, Aug. 2000.

_____. Will green tea be even better tea to increase coronary flow velocity reserve? **American Journal of Cardiology**, New York, v. 94, n. 9, p. 12-23, Nov. 2004.

CHENG, Y. et al. Temporal changes in aroma release of longjing tea infusion: interaction of volatile and nonvolatile tea components and formation of 2-butyl-2-octenal upon aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 6, p. 2160-2169, Feb. 2008.

COELHO, H. E. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2002. 235 p.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, London, v. 7, n. 2, p. 66-76, Apr. 1996.

CUVELIER, M. E.; MAILLARD, M. N.; BERSET, C. Synergistic and antagonistic effect in pure phenolic antioxidant mixtures and in plant extracts. In: CONGRESS OF THE EUROPEAN SECTION OF AOCS, 1., 1996, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: AOCS, 1996. p. 19-20.

DELEVE, L. D.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug induced liver disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 459-475, Aug. 1995.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, Elmsford, v. 65, n. 4, p. 337-353, June 1999.

DITTRICH, R. et al. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 13, p. 3900-3904, May 2003.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, maio/jun. 2007.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest findings on the health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 7, p. 404-421, July 2001.

DULOO, A. G. et al. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24h energy expenditure and fat oxidation in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, n. 6, p. 1040-1045, Dec. 1999.

EDWARDS, M. J.; KELLER, B. J.; THURMAN, R. G. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 119, n. 2, p. 275-279, 1993.

FANARO, G. B. **Efeito da radiação ionizante em formação de voláteis em chás da planta *Camellia sinensis* (L.)**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FARIA, F.; SANTOS, R. de S.; VIANNA, L. M. Consumo de *Camellia sinensis* em população de origem oriental e incidência de doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 275-279, mar./abr. 2006.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). **IL Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 2, p. 397-401, Apr. 2001.

FERREIRA, E. A. **Avaliação do potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos da acetofenona**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. 6. ed. São Paulo: Estação Liberdade, 2007. 611 p.

FONTANIELLA, B. et al. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, n. 11, p. 1027-1036, Nov. 2003.

GIBONEY, P. T. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. **American Family Physician**, Kansas, v. 71, n. 4, p. 1105-1110, Dec. 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, Aug. 1994.

HARA, Y.; LUO, R. L.; WICKREMASHINGHE, T. Y. Botany: of tea. **Foods Review International**, London, v. 11, n. 6, p. 371-374, Mar. 1995.

HAROLD, N.; GRAHAM, P. D. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, San Diego, v. 21, n. 3, p. 334-350, May 1992.

HASTAK, K. et al. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate induced apoptosis of LNCaP cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 31, p. 4851-4859, July 2003.

HERTOG, M. G. L. et al. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 65, n. 5, p. 1489-1494, May 1997.

IMTIAZ, A. S. et al. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 6, n. 3, p. 571-582, 2004.

JAVED, S.; SHUKLA, Y. Effect of black tea extract on transplantable and solid tumors in swiss albino mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, Beijing, v. 13, p. 213-218, Aug. 2000.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1424 p.

KOO, S. I.; NOH, S. K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 18, n. 3, p. 179-183, Mar. 2007.

KWON, D. Y. et al. Comparison of peroxy radical scavenging capacity of commonly consumed beverages. **Archives of Pharmacal Research**, Netherlands, v. 32, p. 283-287, 2009.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá-verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 257-269, mar./abr. 2009.

LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Antioxidant activity of black tea vs. green tea. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 4, p. 785-790, Apr. 2002.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 87-94, mar./abr. 2003.

LEUNG, L. K. et al. Teaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 9, p. 2248-2251, Sept. 2001.

LI, Y. M. et al. Effects of tea polyphenols on hepatic fibrosis in rats with alcoholic liver disease. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, Hangzhou, v. 3, n. 4, p. 577-579, Nov. 2004.

LIAO, S.; KAO, Y. H.; HIIPAKKA, R. A. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. **Vitamins and Hormones, Advances in Research and Applications**, New York, v. 62, n. 1, p. 1-94, Dec. 2001.

LIMA, E. C. C. B. **Utilização de quitosana no processo de clarificação do caldo de cana para fabricação de açúcar do tipo mascavo**. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) *Bertoni*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1/2, jan./ago. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161997000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 1 out. 2010.

LIN, Y. S.; WU, S. S.; LIN, J. K. Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide suppressing effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 975-980, Oct. 2003.

LONDON, R. S. Saccharin and aspartame: are they safe to consume during pregnancy? **Journal of Reproductive Medicine**, Saint Louis, v. 33, n. 1, p. 17-21, Feb. 1988.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

MADAN, S. et al. *Stevia rebaudiana* (BERT.) *Bertoni*: a review. **Indian Journal of Natural Resources**, New Delhi, v. 1, n. 3, p. 267-286, Sept. 2009.

MANTENA, S. K. et al. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 135, n. 12, p. 2871-2877, Dec. 2005.

MATES, J. M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. M. Role of oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 32, n. 2, p. 157-170, Feb. 2000.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 401-407, mar./abr. 2006.

MEZEY, E. Interaction between alcohol and nutrition in the pathogenesis of alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 11, n. 4, p. 340-348, Nov. 1991.

MIRANDA, P. C.; SANTOS, P. C. G. Degeneração hidrópica. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, ano 6, n. 10, jan. 2008. Disponível em:
<<http://www.ideal.tur.br/revista/veterinaria/default.asp?revista=MV&numero=17>>. Acesso em: 10 maio 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, Mysore, v. 26, p. 211-219, Dec. 2003.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, Lugo, v. 6, n. 1, p. 41-47, 2007.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimento de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 315-320, jan./mar. 2009.

MUKAI, T. et al. A novel method for preparation of animal models of liver damage: liver targeting of carbon tetrachloride in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, n. 11, p. 1494-1497, Nov. 2002.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 7, n. 6, p. 1698-1702, June 2000.

NAG-CHAUDHURI, A. K. et al. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (Sikkim variety). **Pharmacological Research**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 169-175, Feb. 2005.

NAKAMOTO, K. et al. Beneficial effects of fermented green tea extract in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical and Biochemistry Nutrition**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 239-246, May 2009.

NOORI, S. et al. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by coffee and green tea. **Pakistan Journal of Nutrition**, Lahone, v. 8, n. 4, p. 452-458, 2009.

OWUOR, P. O. et al. Influence of region of production on clonal black tea chemical characteristics. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 1, p. 263-271, May 2008.

OZERCAN, I. H. et al. Does coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄)? **Hepatology Research**, Cambridge, v. 35, p. 163-168, June 2006.

PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHO-DA-SILVA, D. Uma xícara (chá) de química. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 3, n. 1, p. 27-36, 2011.

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH Radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 26, p. 10074-10079, Dec. 2005.

PERES, W. et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, Oxfordshire, v. 33, n. 11, p. 742-750, Nov. 2000.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, July 2000.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Berne, v. 67, n. 5, p. 289-297, May 1997.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Hasselt, v. 7, n. 1, p. 9-16, Jan. 1998.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 11, p. 2182-2185, Nov. 1992.

RICE-EVANS, C. Implications of the mechanism of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 220, p. 262-266, 1999.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 1, p. 3285-3292, Oct. 2003.

RUSAK, G. et al. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 2, p. 852-858, Feb. 2008.

RUSAK, G.; KRAJACIC, M.; PLESE, N. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from centaurea rupestris L. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 36, p. 125-129, 1997.

SANTANA-RIOS, G. et al. Potent antimutagenic activity of White tea in comparison with Green tea in the Salmonella assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 495, n. 1, p. 61-74, 2001.

SANTHOSH, K. T.; SWARNAM, J.; RAMADASAN, K. Potent suppressive effect of green tea polyphenols on tobacco-induced mutagenicity. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, n. 2, p. 216-220, Nov. 2005.

SARKAR, A.; BHADURI, A. Black tea is a powerful chemopreventer of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 284, n. 2, p. 173-178, 2001.

SCHMITZ, W. et al. O chá-verde e suas ações como quimioprotetor. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 119-130, jul./dez. 2005.

SENGOTTUVELU, S. et al. Hepatoprotective activity of *Camellia sinensis* and its possible mechanism of action. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 7, n. 1, p. 9-14, Jan. 2008.

SHARMA, V.; KUMAR, H. V.; RAO, L. J. M. Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 1, p. 124-129, Feb. 2008.

SIDDIQUI, I. A. et al. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 6, n. 3, p. 571-582, June 2004.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, Feb. 1993.

SILVA, F. C. et al. **Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melaço, rapadura e açúcar mascavo**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 155 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar./abr. 2007.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v. 46, p. S14-S18, 1997. Supplement.

SU, L. et al. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 10, p. 990-997, Oct. 2007.

TAMAYO, R. P. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 3, n. 1, p. 112-120, Mar. 1983.

THRING, S. A. T.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New Rochelle, v. 27, n. 9, p. 1-11, Aug. 2009.

TOKUNAGA, S. et al. Green tea consumption and serum lipids and lipoproteins in a population of healthy workers in Japan. **Annals of Epidemiology**, Sofia, v. 12, n. 3, p. 157-165, Apr. 2002.

TORLONI, M. R. et al. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 267-275, set./out. 2007.

TREVISANATO, S. I.; KIM, Y. I. Tea and health. **Nutrition Reviews**, New York, v. 58, n. 1, p. 1-10, Jan. 2000.

UNACHUKWU, U. J. et al. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxantie and antioxidant profiles. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 6, p. 541-548, June 2010.

YAM, T. S.; SHAH, S.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. Microbiological activity of whole and fractioned crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 169-174, Feb. 1997.

YANG, S. C.; LANDEU, M. J. Effect of tea consumption on nutrition and health. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 1, p. 2409-2412, Oct. 2000.

ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, p. 207-208, 2006.

ZHAO, Y. et al. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 6, p. 1269-1277, June 2011.

ZHI, Z. et al. Polyphenols from *Camellia sinensis* attenuate experimental cholestasis-induced liver fibrosis in rats. **American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 8, p. 1004-1013, June 2003.

_____. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. **American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 4, p. 957-964, Oct. 2002.

APÊNDICE A

Tabela 1A	Resumo da análise de variância para os valores da ação antioxidante <i>in vitro</i> dos chás pelos métodos de seqüestro de radicais livres DPPH e pelo sistema β caroteno / ácido linoléico.....	75
Tabela 2A	Resumo da análise de variância para os valores de peso corporal, peso do fígado e relação peso do fígado / peso corporal.....	75
Tabela 3A	Resumo da análise de variância para os valores das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol mda / mg de tecido) (TBARS) em animais tratados com os chás-verde, branco e preto (7 dias) e água.....	757
Tabela 4A	Resumo da análise de variância para os valores de AST e ALT determinados para avaliação da função hepática dos animais experimentais.....	757
Tabela 5A	Resumo da análise de variância para os valores de Gama GT e glicose determinados para avaliação da função hepática dos animais experimentais.....	758

Tabela 1A Resumo da análise de variância para os valores da ação antioxidante *in vitro* dos chás pelos métodos de seqüestro de radicais livres DPPH e pelo sistema β caroteno / ácido linoléico, com fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias.

F.V.	G.L.	DPPH	B caroteno / ácido linoléico
Chá	2	87,274*	482,1557*
Adoçante	4	136,8546*	468,4881*
Chá VS Adoçante	8	62,9805*	752,4155*
Erro	30	0,5001	22,4692
Média	-	88,3997	67,0818
CV%	-	0,81	7,07

* Significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 2A Resumo da análise de variância para os valores de peso corporal, peso do fígado e relação peso do fígado / peso corporal, com fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias.

F.V.	G.L.	Variáveis				
		Peso Inicial	Peso Final	Varição	Peso do Fígado	Relação peso do fígado / peso corporal
Tratamentos	4	114,0146	352,4033	410,2168**	3,9714	0,000143**
Erro	18	203,8083	310,2388	56,1306	1,4639	0,000018
Média		203,8695	191,2173	-12,6522	7,3826	0,0386
C.V. (%)		7,00	9,21	-59,22	16,39	11,03

** Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 3A Resumo da análise de variância para os valores das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol MDA / MG de tecido) (TBARS) em animais tratados com os chás-verde, branco e preto (7 dias) e água, com fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias.

F.V.	G.L.	TBARS
Tratamentos	4	0,0541*
Erro	18	0,0038
Média		0,2882
C.V. (%)		21,38

* Significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 4A Resumo da análise de variância para os valores de AST e ALT determinados para avaliação da função hepática dos animais experimentais, com fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias.

F.V.	G.L.	Variáveis	
		AST	ALT
Tratamentos	4	11989,4012**	5138,2433**
Erro	18	9,3256	16,1186
Média		101,3091	62,8604
C.V. (%)		3,01	6,39

** Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 5A Resumo da análise de variância para os valores de Gama GT e glicose determinados para avaliação da função hepática dos animais experimentais, com fontes de variação, números de graus de liberdade, quadrados médios e respectivas significâncias.

F.V.	G.L.	Gama GT	Glicose
Tratamentos	4	0,7375**	793,2582**
Erro	18	0,0529	171,8068
Média		1,6598	126,5253
C.V. (%)		13,86	10,36

** Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade